Microlog Microfiche Collection
Resolution Chart

Copyright

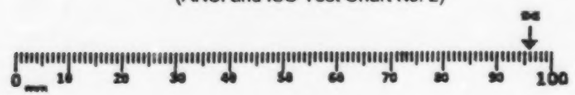
Copyright for the ***contents*** of this microfiche is held by the publisher of the original document. Please contact the original publisher for guidance in all copyright matters. Copyright in this ***microfiche edition*** is held by Micromedia Limited.

Quality of the Microfiche Reproduction

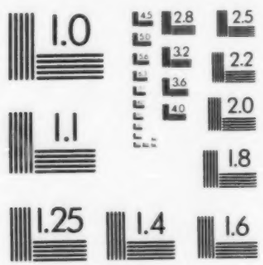
Micromedia Limited maintains the highest standards for micrographic reproduction. Attempts are made to obtain the best quality print version to microfilm. However, there are some printing styles, colours and graphic layout styles (including maps, graphs and tables) which do not reproduce well. Because of the value of the original document, Micromedia has filmed it recognizing that it may not be as easy to read as the original document.

Some pages have been filmed twice to improve the clarity of the reproduction. Consult both reproductions to ensure that all of the original text is read.

Microcopy Resolution Test Chart
National Bureau of Standards
Standard Reference Material 1010a
(ANSI and ISO Test Chart No. 2)



PM-1 3½"x4" PHOTOGRAPHIC MICROCOPY TARGET
NBS 1010a ANSI/ISO #2 EQUIVALENT



MS109

NATIONAL MICROGRAPHICS ASSOCIATION

24x

micromedia
a division of IHS Canada

20 Victoria Street, Toronto, ON M5C 2N8
Tel.: (416) 362-5211
Toll free: 1-800-387-2689
Fax: (416) 362-6161

Collection MICROLOG sur Micromédia
Tableau de résolution

Droits d'auteurs

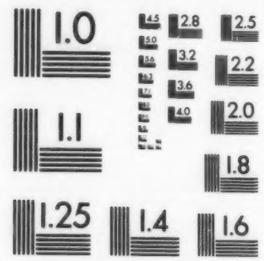
Les droits d'auteurs du conenu de cette microfiche sont détenus par l'éditeur du document original. Veuillez communiquer avec celui-ci pour obtenir des renseignements sur tout ce qui touche les droits d'auteurs. Les droits d'auteurs de cette édition sur microfiche sont détenus par Micromédia Limitée.

Qualité de reproduction sur microfiche

Micromédia Limitée maintient les normes de reproduction micrographique les plus élevées. Elle fait tout son possible pour obtenir la version sur papier à reproduire sur microfiche de la meilleure qualité possible. Cependant, certains styles d'imprimerie, de couleurs et de style de mise en page graphique (incluant des cartes, des grahiques et des tableaux) se reproduisent mal. En raison de la valeur du document original, Micromédia l'a reproduit tout en reconnaissant qu'il ne sera peut-être pas aussi lisable que le document original.

Tableau de résolution micrographique
National Bureau of Standards
Standard Reference Material 1010a
(ANSI and ISO Test Chart No. 2)

PM-1 3½"x4" PHOTOGRAPHIC MICROCOPY TARGET
NBS 1010a ANSI/ISO #2 EQUIVALENT



MS109

NATIONAL MICROGRAPHICS ASSOCIATION

24x

micromedia
a division of IHS Canada

20 Victoria Street, Toronto, ON M5C 2N8
Tel.: (416) 362-5211
Toll free: 1-800-387-2689
Fax: (416) 362-6161

Health Canada Santé Canada

GUIDANCE FOR INDUSTRY

Derivation and Characterisation of Cell Subtrates Used for Production of Biotechnological / Biological Products

ICH Topic Q5D

Published by authority of the
Ministry of Health

Date Adopted by the TPP	1999/12/16
Effective Date	2001/01/05

Therapeutic Products Programme
Guidance Document

Canada

Our mission is to help the people of Canada maintain and improve their health.

Health Canada

Our mission is to ensure that the drug, medical devices, and other therapeutic products available in Canada are safe, effective and of high quality and that narcotic and restricted substances are not abused or diverted from legitimate uses.

Therapeutic Products Programme

THERAPEUTIC PRODUCTS PROGRAMME WEBSITE
(TP-Web)

LET YOUR COMPUTER DO THE SEARCHING!

... Need to know how to market a new drug in Canada?

... Want information on the drug regulatory process?

... Need to know what the newest drugs on the Canadian market are?

... Want direct access to forms and policies?

... Need to know the requirements for labelling drugs?

All this and more is available on the

Therapeutic Products Programme Website
at
www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut

© Minister of Public Works and Government Services Canada 2000

Available in Canada through
Health Canada - Publications
Brooke Claxton Building, A.L. #0913A
Tunney's Pasture
Ottawa, Ontario
K1A 0K9

Tel: (613) 954-5995
Fax: (613) 941-5366

Également disponible en français sous le titre : *Préparation et Caractérisation des Substrats Cellulaires Utilisés pour la Production de Produits Biologiques ou Issus de la Biotechnologie*

Catalogue No. H42-2/67-21-2000E
ISBN 0-662-29197-2

FOREWORD

This guidance has been developed by the appropriate ICH Expert Working Group and has been subject to consultation by the regulatory parties, in accordance with the ICH Process. The ICH Steering Committee has endorsed the final draft and recommended its adoption by the regulatory bodies of the European Union, Japan and USA.

In adopting this ICH guidance, the Therapeutic Products Programme (TPP) endorses the principles and practices described therein. This document should be read in conjunction with the accompanying covering letter and with the relevant sections of other applicable Programme guidances.

Guidance documents are meant to provide assistance to industry and health care professionals on **how** to comply with the TPP policies and governing statutes and regulations. They also serve to provide review and compliance guidance to TPP staff, thereby ensuring that the Programme's mandate is implemented in a fair, consistent and effective manner.

Guidance documents are administrative instruments not having force of law and, as such, allow for flexibility in approach. Alternate approaches to the principles and practices described in this document ***may be*** acceptable provided they are supported by adequate scientific justification. Alternate approaches should be discussed in advance with the Programme to avoid the possible finding that applicable statutory or regulatory requirements have not been met.

As a corollary to the above, it is equally important to note that the Programme reserves the right to request information or material, or define conditions not specifically described in this guidance, in order to allow the Programme to adequately assess the safety, efficacy or quality of a therapeutic product. The TPP is committed to ensuring that such requests are justifiable and that decisions are clearly documented.

TABLE OF CONTENTS

1. INTRODUCTION 1

1.1 Objective 1

1.2 Rationale 1

1.3 Scope 1

2.0 GUIDELINES 2

2.1 Source, History, and Generation of the Cell Substrate 2
2.1.1 Introduction 2
2.1.2 Origin, Source, and History of Cells 2
2.1.3 Generation of the Cell Substrate 4

2.2. Cell Banking 5
2.2.1 Cell Banking System 5
2.2.2 Cell Banking Procedures 6

2.3. General Principles of Characterisation and Testing of Cell Banks 7
2.3.1. Tests of Identity 8
2.3.1.1 Metazoan Cells 9
2.3.1.2 Microbial Cells 9
2.3.2 Tests of Purity 9
2.3.2.1 Metazoan Cells 10
2.3.2.2 Microbial Cells 11
2.3.3 Cell Substrate Stability 11
2.3.4 Tests for Karyology and Tumorigenicity 13

3.0. GLOSSARY 14

APPENDIX 1: PRIMARY CELL SUBSTRATES 16

1. INTRODUCTION

1.1 Objective

The objective of this guideline is to provide broad guidance on appropriate standards for the derivation of human and animal cell lines and microbial cells to be used to prepare biotechnological/biologicalproducts defined in *Section 1.3, Scope,* and for the preparation and characterisation of cell banks to be used for production. The document, therefore, provides recommendations on the information in these areas that should be presented in market applications for these products.

1.2 Rationale

Historically, some quality concerns for cell-derived biological products have originated from the presence of adventitious contaminants or from the properties of the cells used to prepare the product. Recombinant DNA (rDNA) - derived products also carry quality concerns regarding the expression construct contained in the cell substrate. Thus, it is well established that the properties of the cell substrate and events linked to the cell substrate can affect resultant product quality and safety and, further, that effective quality control of these products requires appropriate controls on all aspects of handling the cell substrate.

This document complements other guidelines to provide a comprehensive approach to quality issues arising from biological aspects of processing products from metazoan and microbial cell culture.

1.3 Scope

This guideline covers cell substrates having a cell banking system. In this document, 'cell substrate' refers to microbial cells or cell lines derived from human or animal sources that possess the full potential for generation of the desired biotechnological/biologicalproducts for human *in vivo* or *ex vivo* use. Reagents for *in vitro* diagnostic use are outside the scope of this document. Animal sources of cell lines include all those of metazoan origin. Both continuous cell lines of indefinite in vitro lifespan and diploid cells of finite *in vitro* lifespan are included. Microbial sources include bacteria, fungi, yeast, and other unicellular life forms.

"Biotechnological/biological products" refers to any products prepared from cells cultivated from cell banks with the exception of microbial metabolites such as, for example, antibiotics, amino acids, carbohydrates, and other low molecular weight substances. Cell banks used to prepare gene therapy products or vaccines should follow the recommendations presented in this document. Some biological products, such as certain viral vaccines, are prepared in primary cell cultures derived directly from animal tissues or organs. Primary cells are not banked and therefore are not addressed by this document. However, other considerations which may apply to primary cells are discussed further in Appendix 1 of this document.

2.0 GUIDELINES

2.1 Source, History, and Generation of the Cell Substrate

2.1.1 Introduction

It is important to provide supportive documentation which describes the history of the cell substrate that is used in the manufacture of a biotechnological/biological product, as well as any parental cell line from which it was totally or partially derived. Events during the research and development phases of the cell substrate may contribute significantly to assessment of the risks associated with the use of that particular cell substrate for production. The information supplied in this regard is meant to facilitate an overall evaluation which will ensure the quality and safety of the product.

Careful records of the manipulation of the cell substrate should be maintained throughout its development. Description of cell history is only one tool of many used for cell substrate characterisation. In general, deficiencies in documented history may not, by itself, be an impediment to product approval, but extensive deficiencies will result in increased reliance on other methods to characterise the cell substrate.

2.1.2 Origin, Source, and History of Cells

The source of cells (laboratory or culture collection) from which the cell substrate was derived should be stated, and relevant references from the scientific literature should be cited. Information obtained directly from the source laboratory is preferred. When this is not available, literature references may be utilised.

For human cell lines, it is relevant to describe the following characteristics of the original donor: Tissue or organ of origin, ethnic and geographical origin, age, sex and general physiological condition. If known, the state of health or medical history of the donor should be reported along with the results of any tests of the donor for pathogenic agents. Specifically for human diploid fibroblasts, the age of the donor may influence the in vitro lifespan of the cell line and this information should be provided if available. For animal cell lines, relevant descriptions of the source include species, strains, breeding conditions, tissue or organ of origin, geographical origin, age and sex, the results of tests for pathogenic agents, and general physiological condition of the original donor.

For microbes, manufacturers should describe the species, strain, and known genotypic and phenotypic characteristics of the organism from which the cell substrate was derived. Manufacturers should also describe the pathogenicity, toxin production, and other biohazard information, if any.

The cultivation history of the cells should be documented. The method originally used for the isolation of the cells should be described as well as the procedures used in the culturing of the cells *in vitro* and any procedures used to establish cell lines (for example, use of any physical, chemical, or biological procedure, or added nucleotide sequences). A description of any genetic manipulation or selection should be provided. All available information regarding the identification, characteristics, and results of testing of these cells for endogenous and adventitious agents should be provided.

For continuous cell lines of metazoan origin, it is usually adequate to quantitate culture duration by estimation of either number of population doublings, or number of subcultivations at defined dilution ratio, or time in days. For diploid cell lines possessing finite *in vitro* lifespan, accurate estimation of the number of population doublings during all stages of research, development, and manufacturing is important. For microbial cells, documentation of subcultivation frequency after cell substrate generation is considered adequate.

Regarding the generation of cell substrates, applicants should provide a thorough discussion of procedures which would provide exposure to infectious agents. Constituents of the culture medium should be described, in particular, information regarding exposure of the cells to materials of human or animal origin such as serum, enzymes, hydrolysates, or other living cells. The description should include the source,

method of preparation and control, test results, and quality assurance. Relevant literature on these points may be referenced when available. This information will allow a detailed analysis of potential entry routes for adventitious agents from these sources, and will be part of the risk-benefit analysis of the product.

2.1.3 Generation of the Cell Substrate

A crucial step is the choice of a suitable parental cell line. For recombinant products, a parental cell line is typically the untransfected recipient cell line. The use of characterised parental cell banks is suggested, but is not considered essential. A characterised parental cell bank may be of benefit, especially when multiple cell substrates are generated from the same parental cell type, by providing a set of information on which the quality assessment of the Master Cell Bank (MCB) can be based. For example, the myeloma cell line may be banked as a parental cell line for hybridomas.

During the generation of the cell substrate, one or more specific procedures may be utilised in the ultimate development of the desired characteristics. These may include, for example, cell fusion, transfection, selection, colony isolation, cloning, gene amplification, and adaptation to specific culture conditions or media. Information regarding the methodologies utilised in developing the cell substrate can help to provide a clear understanding of the history of the cell substrate. Some cell substrates such as human diploid fibroblasts may not need extensive manipulation or cloning prior to cell banking.

For recombinant products, the cell substrate is the transfected cell containing the desired sequences, which has been cloned from a single cell progenitor. For further information on generation of rDNA-modified cell substrates, consult other relevant (e.g., regional or international) guidelines. For non-recombinant products or nonrecombinant vaccines, the cell substrate is the cell from the parental cell line chosen for preparation of the MCB without further modification. For products derived from hybridomas, the cell substrate is the hybridoma cell line derived by fusion of the parental myeloma cell line with other parental cells, e.g., immune spleen cells.

2.2. Cell Banking

One of the most important advantages of using serially subcultivated cells to produce biotechnological/biological products is the ability to have a characterised common starting source for each production lot, i.e., the preserved bank of cells. Manufacturers may prepare their own cell banks, or may obtain them from external sources. Manufacturers are responsible for ensuring the quality of each cell bank and of the testing performed on each bank.

2.2.1 Cell Banking System

The concept of a two-tiered cell bank, in which the MCB which is used to generate Working Cell Banks (WCBs), is generally accepted as the most practical approach to providing a supply of cell substrate for continued manufacture of the product. Manufacturers should describe their strategy for providing a continued supply of cells from their cell bank(s), including the anticipated utilisation rate of the cell bank(s) for production, the expected intervals between generation of new cell bank(s), and the criteria for qualification of cell bank(s).

Generally, the MCB is made first, usually directly from an initial clone or from a preliminary cell bank derived from an initial clone. It is not considered necessary to prepare cell banks from clones for certain types of cells (e.g., diploid cells, where limited *in vitro* life span or other technical factors make cell cloning impractical) or where the uncloned cell population is already adequately homogeneous for the intended use.

A WCB is derived from one or more containers of the MCB. It is the WCB which is typically used to directly provide cells for the manufacturing process. Additional WCBs are generated from the MCB as needed. A newly prepared WCB should be appropriately qualified by characterisation and testing.

It should be noted that the MCB and WCB may differ from each other in certain respects, e.g., culture components and culture conditions. Similarly, the culture conditions used to prepare the MCB and WCB may differ from those used for the production process. If changes in cell culture process do not affect product quality, it is not considered necessary to reclone the cells or to rebank the MCB or WCB. It is important that a characterised bank provides a consistent product.

A single-tiered banking system consisting only of the MCB but no WCBs could be used in principle, for example, if relatively few containers were needed each year to produce the desired product.

In some microbial expression systems, a new transformation is performed for each new cell substrate container lot, based upon using aliquots of thoroughly tested host cell banks and plasmid banks for each new transformation and on testing of each transformed cell substrate bank. This transformed cell substrate bank is considered the MCB, and it is used as the source of cell substrate for production. Host cell banks, plasmid banks, and MCBs are maintained by appropriate preservation methods. This alternative system is considered adequate because the transformation of bacteria and yeast is generally a very reproducible and easily performed process, unlike the events needed for transfection of metazoan cells. Manufacturers should provide information on the host cells, rDNA molecules (such as plasmids), method of transformation and of cell banking, and the results of characterisation studies.

2.2.2 Cell Banking Procedures

It is important to prevent a contaminated cell substrate (or bank) from being used in production and to avoid a loss of product availability or development time resulting from the need to recreate a cell bank found to be unusable due to contamination. It is recognised that no cell bank testing regimen is able to detect all potential contaminants; therefore, use of these preventive principles during cell banking is important to provide reasonable assurance of the absence of contamination and to provide a reliable source of the cell substrate.

Manufacturers should describe the type of banking system used, the size of the cell bank(s), the container (vials, ampoules, or other appropriate vessels) and closure system used, the methods used for preparation of the cell bank(s) including the cryoprotectants and media used, and the conditions employed for cryopreservation and storage.

Manufacturers should describe the procedures used to avoid microbial contamination and cross-contamination by other cell types present in the laboratory, and the procedures that allow the cell bank containers to be traced. This should include a description of the documentation system as well as that of a labelling system which can withstand the process of preservation, storage, and recovery from storage without loss of labelling information on the container.

Manufacturers should describe their cell banking procedures. Cells are generally prepared for banking by expanding cultures in a progressively greater number or larger size of vessel until a pool of cells can be obtained which is sufficient to generate enough containers for the bank. To ensure the uniform composition of the contents of each container, a single pool of cells for banking should be prepared by combining the cells from all of the culture vessels, if more than one vessel is used.

Cells suspended in preservation medium are aliquoted from the single pool into sterilised containers which are then sealed and stored under appropriate conditions. For example, animal cells in media containing a cryoprotectant are frozen in the sealed containers under defined and controlled conditions, and then transferred to storage in the vapor or liquid phase of liquid nitrogen or at equivalent ultra low temperatures. Other methods of preservation and storage may be adequate depending on the organism used, but they should be capable of maintaining a level of cell viability upon reconstitution which is both consistent and adequate for production use.

To ensure continuous, uninterrupted production of pharmaceuticals, manufacturers should carefully consider the steps that can be taken to provide for protection from catastrophic events that could render the cell bank unusable. Examples of these events include fires, power outages and human error. Manufacturers should describe their plans for such precautions; for example, these may include redundancy in the storage of bank containers in multiple freezers, use of back-up power, use of automatic liquid nitrogen fill systems for storage units, storage of a portion of the MCB and WCB at remote sites, or regeneration of the MCB.

The starting point of reference for estimates of *in vitro* cell age during manufacturing should be the thawing of one or more containers of the MCB. For diploid cell lines, *in vitro* lifespan should be estimated in terms of population doubling levels. The population doubling level at which senescence occurs should be determined for diploid cells.

2.3. General Principles of Characterisation and Testing of Cell Banks

The characterisation and testing of banked cell substrates is a critical component of the control of biotechnological and biological products. Characterisation of the MCB allows the manufacturer to assess this source with regard to presence of cells from other lines, adventitious agents, endogenous agents and molecular contaminants (e.g., toxins or antibiotics from the host organism). The objective of this testing is to confirm the identity, purity, and suitability of the

cell substrate for manufacturing use. In some cases, additional testing such as tumorigenicity or karyology may be useful. The testing program chosen for a given cell substrate will vary according to the biological properties of the cells (for example, growth requirements), its cultivation history (including use of human-derived and animal-derived biological reagents) and available testing procedures. The extent of characterisation of a cell substrate may influence the type or level of routine testing needed at later stages of manufacturing. Manufacturers should perform tests for identity and purity once for each MCB, and tests of stability during cell cultivation once for each product to be registered. In addition, tests of purity and limited tests of identity should be performed once on each WCB. Also, applicants should consult the ICH guideline on viral safety. Relevant tests among those described below should be performed and described in the market application, along with the results of the testing.

For cell lines containing exogenously assembled expression constructs, the relevant ICH guideline on rDNA expression constructs should be consulted for guidance on the characterisation of nucleotide and amino acid sequences. It may also be useful to examine, by similar methods, the coding sequences in some non-recombinant DNA-derived cell lines where the gene sequences have been characterised and are well understood. However, it is not considered necessary to carry out investigations of the sequences encoding complex natural products, for example, families of related gene products, microbial vaccine antigens, or monoclonal antibodies from hybridomas.

Manufacturers are also encouraged to employ 'state-of-the-art' methods and technological improvements in cell substrate characterisation and testing as they become available, as long as the specificity, sensitivity, and precision of the newer methods are at least equivalent to those of existing methods.

The manufacturer may choose to characterise the WCB instead of the MCB, if justified.

2.3.1. Tests of Identity

Appropriate tests should be performed to determine that the banked cell is what it is represented to be. Either phenotypic or genotypic characteristics may be used in identity testing. It is not considered necessary to do all the possible tests. Tests of identity are generally performed on the MCB. In addition, limited identity testing is generally performed on each WCB.

2.3.1.1 Metazoan Cells

For human or animal cells which grow attached to a substratum, morphological analysis may be a useful tool in conjunction with other tests. In most cases, isoenzyme analysis is sufficient to confirm the species of origin for cell lines derived from human or animal sources; other tests may be appropriate depending on the history of the cell line. Other technologies may be substituted to confirm species of origin, including, for example, banding cytogenetics or use of species-specific antisera. An alternative strategy would be to demonstrate the presence of unique markers, for example, by using banding cytogenetics to detect a unique marker chromosome, or DNA analysis to detect a genomic polymorphism pattern (for example, restriction fragment length polymorphism, variable number of tandem repeats, or genomic dinucleotide repeats). Either confirmation of species of origin or presence of known unique cell line markers is considered an adequate test of identity. Expression of the desired product may represent a complementary approach to confirmation of identity.

2.3.1.2 Microbial Cells

For most microbial cells, analysis of growth on selective media is usually adequate to confirm host cell identity at the species level for the host cell bank and the transformed cell bank. For *E. coli,* where a variety of strains may be used, biological characterisation methods such as phage typing should be considered as supplementary tests of identity. For plasmid banks, identity assessment can be accomplished as described by the ICH document on analysis of the expression construct. Expression of the desired product is also considered adequate to confirm the identity of the microbial expression system.

2.3.2 Tests of Purity

A critical aspect of cell development and banking is the assessment that the MCB and WCB are biologically pure, i.e., are free from adventitious microbial agents and adventitious cellular contaminants. The impact of selective agents and antibiotics on the detection of adventitious microbial contaminants should be considered when planning and performing these tests.

2.3.2.1 Metazoan Cells

Tests for the presence of bioburden (bacteria and fungi) should be performed on individual containers (1 % of the total number but not less than two containers) of the MCB and WCB. In all other aspects, the current methodologies described in either the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), the Japanese Pharmacopoeia (JP) or the U.S. Pharmacopoeia (U.S.P.) for testing microbial limits or microbial sterility may be considered adequate.

Tests for the presence of mycoplasma should be performed on the MCB and WCB. Current procedures considered adequate include both the agar and broth media procedures as well as the indicator cell culture procedure. Current methods for mycoplasma testing are described in Ph. Eur., JP, and 'Points to Consider in the Characterisation of Cell Lines Used to Produce Biologicals' (FDA, CBER, 1993). Testing cells derived from a single container is generally considered adequate. For non-mammalian animal cell lines, alternative controls and/or assay conditions may be appropriate; manufacturers should consult with the national/regional regulatory authority for appropriate methodology.

If future efforts to harmonize bioburden and mycoplasma assays are fruitful, then the scientifically appropriate harmonized assay should be used.

Virus testing of cell substrates should be designed to detect a wide spectrum of viruses by using appropriate screening tests and relevant specific tests, based on the cultivation history of the cell line, to detect possible contaminating viruses. Applicants should consult the ICH guideline on viral safety. For product classes not covered by the viral safety guideline, the current World Health Organization (WHO) documents for use of animal cells may be consulted.

The purity of cell substrates can be compromised through contamination by cell lines of the same or different species of origin. The choice of tests to be performed depends upon whether opportunities have existed for cross-contamination by other cell lines. In some cases, it may be necessary to maintain growing cultures of different cell lines in the same laboratory. During procedures in cell banking where open manipulations are performed, care should be taken to ensure that simultaneous open manipulations of other cell lines are avoided to prevent cross-contamination.

Whenever another cell line was present in the cell banking room at the same time that open cell banking procedures were being performed (such as cell expansion, pooling, or aliquoting of the chosen cell line), the cell banks should be tested for the presence of cells from (or products derived from) the second cell line. In general, the methods described in *Section 2.3.1* to assess cell identity are also considered adequate tests to detect cross contamination by other cell lines. Additional assurance of lack of cross-contamination can be provided by successful preparation of the intended product from the cell substrate.

2.3.2.2 Microbial Cells

The design and performance of specific tests for adventitious microbial agents and adventitious cellular contaminants in microbial cell banks should take into account the properties of the banked cell, the likely contaminants based upon scientific literature, source, methods and materials used for cultivation, and other organisms present in the banking laboratory. For example, visual examination of the characteristics of well-isolated colonies is suggested, using several microbiological media, of which some do and some do not support growth of the cell substrate. However, it is not intended that manufacturers necessarily characterise resistant mutants of the cell substrate arising from such studies, or other artifacts of such assays. Rather, the purpose of such assays is to detect existing contaminants.

2.3.3 Cell Substrate Stability

Another dimension to cell characterisation is appropriateness for intended use in production. There are two concerns for cell substrate stability: Consistent production of the intended product and retention of production capacity during storage under defined conditions.

For the evaluation of stability during cultivation for production, at least two time points should be examined, one using cells which have received a minimal number of subcultivations, and another using cells at or beyond the limit of *in vitro* cell age for production use described in the marketing application. The limit of *in vitro* cell age for production use should be based on data derived from production cells expanded under pilot plant scale or commercial scale conditions to the proposed limit of *in vitro* cell age for production use or beyond. Generally, the production cells are obtained by expansion of cells from the WCB; cells from the MCB could be used with appropriate justification. This demonstration of cell substrate stability is commonly performed once for each product marketing application.

Evaluation of the cell substrate with respect to the consistent production of the intended product of interest should be the primary subject of concern. The type of testing and test article(s) used for such assessments will depend on the nature of the cell substrate, the cultivation methods, and the product. For cell lines containing recombinant DNA expression constructs, consistency of the coding sequence of the expression construct should be verified in cells cultivated to the limit of *in vitro* cell age for production use or beyond by either nucleic acid testing or product analysis, as described in the relevant ICH guideline. For non-recombinant cell lines in which the coding sequence for the desired product has already been analyzed at the MCB or WCB level, invariability of the protein coding sequence during production should be verified in the production cells cultivated to the proposed limit of *in vitro* cell age for production use or beyond by either nucleic acid testing or analysis of the purified protein product.

Where the product cannot be analyzed as described above, other specific traits which may include, for example, morphological characteristics, growth characteristics, biochemical markers, immunological markers, productivity of the desired product, or other relevant genotypic or phenotypic markers may be useful for the assessment of cell substrate stability. In some cases, where direct comparison of the characteristics of the MCB with those of the production cells at or beyond the limit of *in vitro* cell age is difficult or impossible, one may compare the characteristics of cells at the initial stages of cultivation or production to those of cells at or beyond the limit of *in vitro* cell age for production use in order to assess cell stability during production. Indices such as, for example, oxygen or glucose consumption rates, ammonia or lactate production rates may be useful for such testing. Increases in the defined limit of *in vitro* cell age for production use should be supported by data from cells which have been expanded to the proposed new limit of *in vitro* cell age. For diploid cell lines, data should be presented that establish the finite *in vitro* lifespan of the cells from the WCB under conditions representative of those employed for manufacturing use.

Evidence for banked cell stability under defined storage conditions will usually be generated during production of clinical trial material from the banked cells. Data from the determination of cell viability when the preserved cells are reconstituted for production of clinical trial supplies will verify that the revived cells have survived the preservation process. Data from the preparation of clinical materials will demonstrate that the revived cells can be used to prepare the desired product. Available data should be clearly documented in the application dossiers, plus a proposal for monitoring of banked cell stability should be provided. The proposed monitoring can be performed at the time that one or more containers

of the cryopreserved bank is thawed for production use, when the product or production consistency is monitored in a relevant way, or when one or more containers of the cryopreserved MCB is thawed for preparation of a new WCB (and the new WCB is properly qualified), as appropriate. In the case when production does not take place for a long period of time, viability testing on the cell bank used as a source of the production substrate should be performed at an interval described in the marketing application. If the viability of the cell substrate is not significantly decreased, generally no further testing of the MCB or WCB is considered necessary.

2.3.4 Tests for Karyology and Tumorigenicity

Utilisation of karyology and tumorigenicity testing for evaluating the safety of a diploid cell line or characterizing a new cell line may be useful depending on the cells, the nature of the product and the manufacturing process. Extensive analysis to determine the relative abundance of aneuploid cells has not been found to be useful. Karyology need not be determined for rodent cell lines or new cell lines known to be non-diploid. However, cytogenetic analysis may be an adequate method to assess cell substrate identity or purity as described in *Sections 2.3.1* and *2.3.2*. Repetition of tumorigenicity testing for cells with already documented evidence of tumorigenicity is not considered necessary.

For products that are highly purified and that contain no cells, karyology and tumorigenicity testing are generally not considered necessary, provided that appropriate limits for residual host cell DNA are shown to be consistently met by either process validation studies or by lot release testing.

In general, products for which the presence of live cells cannot be excluded or which have little downstream purification (for example, some conventional live virus vaccines) will need such characterization of the cell substrate. The utility of tumorigenicity testing and chromosomal analysis for new cell substrates for unpurified products should be evaluated on a case-by-case basis. Use of cell lines known to be tumorigenic or to possess abnormal karyology should be evaluated in terms of risk-benefit for each product application when the product contains cells or when not highly purified.

Products that are manufactured in genetically unmodified MRC-5 or WI-38 cells do not need characterization of these cell substrates by karyology or tumorigenicity since extensive characterization has already been performed and published for these cell lines. However, for each MRC-5 and WI-38 WCB generated, manufacturers should confirm, once, that the cells grown in the manner to be used in production are diploid and have the expected lifespan.

For new or previously uncharacterized diploid cell substrates, confirmation of diploid karyology should be presented and tumorigenic potential should be established, using cells from the MCB. Methods for karyological and tumorigenicity analysis may be found in the WHO document "WHO Requirements for Use of Animal Cells as *in vitro* Substrates for the Production of Biologicals" in *WHO Expert Committee on Biological Standardization, 47th Report Geneva, World Health Organization* (WHO Technical Report Series, in press).

3.0. GLOSSARY

Cell bank
A cell bank is a collection of appropriate containers, whose contents are of uniform composition, stored under defined conditions. Each container represents an aliquot of a single pool of cells.

Cell line
Type of cell population which originates by serial subculture of a primary cell population, which can be banked.

Continuous cell line
A cell line having an infinite capacity for growth. Often referred to as 'immortal' and previously referred to as 'established'.

Diploid cell line.
A cell line having a finite *in vitro* lifespan in which the chromosomes are paired (euploid) and are structurally identical to those of the species from which they were derived.

Host cells
See Parental cells.

***In vitro* cell age**
Measure of time between thaw of the MCB vial(s) to harvest of the production vessel measured by elapsed chronological time, by population doubling level of the cells, or by passage level of the cells when subcultivated by a defined procedure for dilution of the culture.

Metazoan
Organism of multicellular animal nature.

MCB (Master Cell Bank)
An aliquot of a single pool of cells which generally has been prepared from the selected cell clone under defined conditions, dispensed into multiple containers and stored under defined conditions. The MCB is used to derive all working cell banks. The testing performed on a new MCB (from a previous initial cell clone, MCB or WCB) should be the same as for the MCB unless justified.

Parental cells
Cell to be manipulated to give rise to a cell substrate or an intermediate cell line. For microbial expression systems, it is typical to also describe the parental cells as the host cell. For hybridomas, it is typical to also describe the parental cells as the cells to be fused.

WCB (Working Cell Bank)
The Working Cell Bank is prepared from aliquots of a homogeneous suspension of cells obtained from culturing the MCB under defined culture conditions.

APPENDIX 1: PRIMARY CELL SUBSTRATES

I. Introduction

The principles contained in this document apply in general to biotechnological/biologicalproducts prepared from characterized banked cells. However, a number of biological products, in particular certain viral vaccines, are prepared using primary cells.

Because primary cell cultures are used within the first passage after establishment from the tissue of origin, it is not possible to carry out extensive characterization of the cells prior to their use as is done for banked cell substrates. In addition, biological products produced using primary cell substrates often do not undergo extensive processing (e.g., purification). Despite these differences, the approach taken to assure the suitability and safety of primary cell substrates for production of biologicals is analogous, in many respects, to that outlined in this document and in other guidelines.

This Annex outlines cell substrate-related information that should be included in marketing applications for biological products prepared using primary cells. This information falls into three general categories: (1) Information concerning the source tissue (or organ) and other animal-derived raw materials used for the establishment of primary cell substrates, (2) information concerning the preparation of primary cell substrates, and (3) testing performed on primary cell substrates to ensure the safety of the product.

II. Source Tissue and Other Raw Materials

Information should be provided about the animals used as a source of tissue for the preparation of primary cell substrates. Tissue should be derived from healthy animals subjected to veterinary and laboratory monitoring to certify the absence of pathogenic agents. Whenever possible, donor animals should be obtained from closed, specific pathogen-free (when available) colonies or flocks. Animals used as tissue donors should not have been used previously for experimental studies. Animals should be adequately quarantined for an appropriate period of time prior to use for the preparation of cells. In some countries, animals may need to be quarantined in the country where the primary cells are prepared. Manufacturers should consult with national/regional authorities for specific requirements.

Information on materials and components used for the preparation of primary cell substrates should be provided, including the identity and source of all reagents of human or animal origin. A description of testing performed on components of animal origin to certify the absence of detectable contaminants and adventitious agents should be included.

III. Preparation of Primary Cell Substrates

Methods used for isolation of cells from tissue, establishment of primary cell cultures and maintenance of cultures should be described.

IV. Testing of Primary Cell Substrates

Tests performed on primary cell substrates to qualify them for use in production should be described. As noted, the nature of primary cell substrates precludes extensive testing and characterization prior to use. Testing to demonstrate the absence of adventitious agents in these substrates is therefore conducted concurrently and may include: Observation of production or uninfected control cultures before, during, and beyond the period of production; inoculation of culture fluids from production and uninfected control cultures into various susceptible indicator cell cultures capable of detecting a wide range of relevant viruses, followed by examination for cytopathic changes and testing for the presence of hemadsorbing viruses; and other tests for specific agents (such as relevant retroviruses) as necessary. Additional information concerning specific viral tests may be found in the relevant national/regional/internationalguidelines.

Appropriate testing regimens and test methods for cells used in the production of specific products will vary depending on the donor species used as a source of tissue, adventitious agents potentially present, the nature of the product, its intended clinical use, aspects of the manufacturing process, and the extent of testing performed on the final product. Applicants should explain and justify the approach taken with respect to their specific product.

Santé Canada Health Canada

LIGNE DIRECTRICE À L'INTENTION DE L' INDUSTRIE

Préparation et caractérisation des substrats cellulaires utilisés pour la production de produits biologiques ou issus de la biotechnologie

ICH thème Q5D

Publication autorisée par le ministre de la Santé

Date d'approbation par le PPT	1999/12/16
Date mis en vigueur par PPT	2001/01/05

Programme des produits thérapeutiques

Canada

Notre Mission est d'aider les Canadiens et les Canadiennes à maintenir et à améliorer leur état de santé.

Santé Canada

Notre Mission: Faire en sorte que les médicaments, les instruments médicaux et les autres produits thérapeutiques disponibles au Canada soient sûrs, efficaces et de grande qualité et que les stupéfiants et drogues d'usage restreint ne fassent l'objet d'aucun abus et ne soient pas détournés de leurs usages légitimes.

Programme des produits thérapeutiques

LE SITE WEB DU PROGRAMME DES PRODUITS THÉRAPEUTIQUES (Web-PT)

LAISSEZ VOTRE ORDINATEUR FAIRE LES RECHERCHES!

...Vous voulez savoir comment commercialiser un nouveau médicament?

...Vous souhaitez obtenir des renseignements au sujet du processus de réglementation des médicaments?

...Vous voulez connaître quels sont les médicaments les plus récemment autorisés au Canada?

...Vous souhaitez avoir un accès direct à nos formulaires et à nos politiques?

...Vous voulez connaître sont les contraintes en matière d' étiquetage des médicaments?

Vous pouvez obtenir ces renseignements et plusieurs autres en consultant

le site web du programme des produits thérapeutiques
à
www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut

© Ministre, Travaux publics et services gouvernementaux Canada 2000

Disponible au Canada par l'entremise de
Santé Canada - Publications
Edifice Brooke Claxton, L. A. #0913A
Pré Tunney
OTTAWA (Ontario)
K1A 0K9

téléphone : (613) 954-5995
télécopieur : (613) 941-5366

also available in English under the following Title: Derivation and characterisation of Cell Substrates used for Production of Biotechnological / Biological Products

N° de catalogue H42-2/67-21-2000F
ISBN 0-662-84886-1

AVANT-PROPOS

La présente ligne directrice a été élaborée par un groupe d'experts de l'ICH et a fait l'objet de consultations, menées par les organismes de réglementation, conformément au processus de l'ICH. Le Comité directeur de l'ICH en a approuvé la version finale et en a recommandé l'adoption par les organismes de réglementation de l'Union européenne, du Japon et des États-Unis.

En adoptant cette ligne directrice de l'ICH, le Programme des produits thérapeutiques (PPT) fait siens les principes et les pratiques qui y sont énoncés. Ce document doit être lu en parallèle avec la lettre d'accompagnement et les sections pertinentes des autres lignes directrices applicables du Programme.

Les lignes directrices sont des documents destinés à guider l'industrie et les professionnels de la santé sur la **façon** de se conformer aux politiques du PPT et aux lois et règlements qui régissent leurs activités. Elles servent également de guide au personnel du PPT lors de l'évaluation et de la vérification de la conformité et permettent ainsi d'appliquer le mandat du Programme d'une façon équitable, uniforme et efficace.

Les lignes directrices sont des outils administratifs n'ayant pas de force de loi, ce qui permet une certaine souplesse d'approche. Les principes et les pratiques énoncés dans le présent document **pourraient être** remplacés par d'autres approches, à condition que celles-ci s'appuient sur une justification scientifique adéquate. Ces autres approches devraient être examinées préalablement en consultation avec le Programme pour s'assurer qu'elles respectent les exigences des lois et des règlements applicables.

Corollairement à ce qui précède, il importe également de mentionner que le Programme se réserve le droit de demander des renseignements ou du matériel supplémentaire, ou de définir des conditions dont il n'est pas explicitement question dans la ligne directrice, et ce, afin d'être en mesure d'évaluer adéquatement l'innocuité, l'efficacité ou la qualité d'un produit thérapeutique donné. Le PPT s'engage à justifier de telles demandes et à documenter clairement ses décisions.

TABLE DES MATIÈRES

1. PRÉAMBULE 1

1.1 Objectif 1

1.2 Justification 1

1.3 Portée 1

2. LES LIGNES DIRECTRICES 2

2.1 Origine, histoire et préparation du substrat cellulaire 2
2.1.1 Introduction 2
2.1.2 Origine, source et histoire des cellules 3
2.1.3 Préparation du substrat cellulaire 4

2.2. Banques de cellules 5
2.2.1 Structure des banques 5
2.2.2 Préparation et entreposage des banques 6

2.3. Principes généraux concernant la caractérisation et la vérification des banques de cellules 8
2.3.1. Épreuves d'identité 9
2.3.1.1 Cellules de métazoaires 9
2.3.1.2 Cellules microbiennes 10
2.3.2 Épreuves de pureté 10
2.3.2.1 Cellules de métazoaires 10
2.3.2.2 Cellules microbiennes 12
2.3.3 Stabilité du substrat cellulaire 12
2.3.4 Épreuves de caryotype et de tumorigénicité 14

3.0. GLOSSAIRE 15

ANNEXE 1 : SUBSTRATS DE CELLULES PRIMAIRES 17

1. PRÉAMBULE

1.1 Objectif

Dans cette ligne directrice, sont décrites les normes générales qu'il convient d'appliquer à la préparation de lignées cellulaires humaines, animales et microbiennes devant servir à la préparation de produits biologiques ou issus de la biotechnologie, définis sous la rubrique *1.3 (Portée)*, ainsi qu'à la constitution et à la caractérisation de banques de cellules utilisées à des fins de production. Par conséquent, diverses recommandations sont énoncées concernant l'information à fournir sur ces aspects dans les demandes de mise en marché de ces types de produits.

1.2 Justification

Historiquement la qualité des produits biologiques d'origine cellulaire a suscité des inquiétudes de par la présence d'agents fortuits contaminants ou à cause des propriétés inhérentes des cellules utilisées pour la fabrication de ces produits. Par ailleurs, la qualité des produits obtenus au moyen d'ADN recombinant (ADNr) suscite également certaines incertitudes à cause de l'introduction de vecteurs d'expression dans le substrat cellulaire utilisé pour leur fabrication. Ainsi il est bien connu que les propriétés et les événements liés au substrat cellulaire peuvent influer sur la qualité du produit qu'ils servent à fabriquer et que le contrôle de la qualité du produit doit englober toutes les étapes du procédé de fabrication reliées à la manipulation du substrat cellulaire.

Ce document complémente d'autres lignes directrices afin de permettre une approche globale en ce qui a trait à la qualité de la composante biologique intrinsèque à la fabrication de produits à partir de cultures de cellules de métazoaires ou de cellules microbiennes.

1.3 Portée

Cette ligne directrice concerne les substrats cellulaires préparés à partir de banques de cellules. L'expression « substrat cellulaire » désigne ici des cellules microbiennes ou des lignées de cellules d'origine humaine ou animale possédant toutes les propriétés nécessaires pour générer des produits biologiques ou issus de la biotechnologie, pour usage humain *in vivo* ou *ex vivo*. Les réactifs de diagnostic *in vitro* sont exclus du portée de la présente ligne directrice. Tous les organismes animaux métazoaires peuvent être la source de lignées cellulaires. La présente ligne directrice s'applique tant aux lignées continues, à durée de vie illimitée *in vitro*, qu'aux cellules diploïdes à durée de vie limitée *in vitro*. Les cellules microbiennes désignent les bactéries, les champignons microscopiques, les levures et autres organismes unicellulaires.

L'expression « produits biologiques ou issus de la biotechnologie» désigne les produits élaborés à partir de cellules issues de banques de cellules, à l'exception des métabolites microbiens comme, par exemple, les antibiotiques, les acides aminés, les glucides et autres substances à faible poids moléculaire. Les recommandations formulées dans la présente ligne directrice s'appliquent aussi aux banques de cellules qui servent à préparer des produits de thérapie génique ou des vaccins. Certains produits biologiques tels que des vaccins antiviraux sont obtenus au moyen de cultures de cellules primaires préparées directement à partir de tissus ou d'organes d'origine animale. Comme on ne constitue pas de banques avec les cellules primaires, celles-ci ne sont pas incluses dans le présent document. Toutefois, certaines considérations qui peuvent s'appliquer aux cultures de cellules primaires sont présentées dans l'Annexe 1.

2. LES LIGNES DIRECTRICES

2.1 Origine, histoire et préparation du substrat cellulaire

2.1.1 Introduction

Il est important que le fabricant joigne à sa demande la documentation spécifique concernant l'histoire du substrat cellulaire utilisé pour la fabrication du produit biologique ou issus de la biotechnologie, ainsi qu'une description des lignées de cellules parentales dont sont issues, partiellement ou entièrement, les cellules composant le substrat cellulaire. Les phénomènes observés durant les phases de recherche et de développement du substrat cellulaire peuvent contribuer de façon significative à l'évaluation des risques associés à son utilisation pour des fins de production. L'information fournie à cet égard pourra faciliter l'évaluation globale, permettant d'assurer la qualité et l'innocuité du produit.

Il convient de noter soigneusement toute manipulation du substrat cellulaire durant la phase de développement. La description de l'historique des cellules n'est qu'un des nombreux outils utilisés pour caractériser un substrat cellulaire. Généralement, une description incomplète de l'historique des cellules ne constitue pas comme tel un obstacle à l'approbation du produit, mais des lacunes importantes vont résulter en une dépendance accrue aux autres méthodes utilisées pour caractériser le substrat cellulaire.

2.1.2 Origine, source et histoire des cellules

Il faut indiquer la provenance des cellules (laboratoire ou collection de cultures) dont est issu le substrat cellulaire, et donner les références des publications scientifiques pertinentes. L'information obtenue directement du laboratoire d'origine est préférable. À défaut de tels renseignements, on peut référer à la littérature.

Dans le cas des lignées de cellules humaines, il est utile de décrire certaines caractéristiques: tissu ou organe d'origine, origine ethnique et géographique, âge, sexe et état physiologique général. Si l'état de santé ou les antécédents médicaux sont connus, il faut en faire état et fournir les résultats de toutes les épreuves de dépistage d'agents pathogènes qu'a subies le donneur. Dans le cas particulier des fibroblastes diploïdes d'origine humaine, il faut indiquer si possible l'âge du donneur, car ce facteur peut influer sur la durée de vie de la lignée *in vitro*. Pour les lignées de cellules animales,une description adéquate de la source doit comprendre les renseignements suivants : espèce, souche, généalogie, tissu ou organe d'origine, origine géographique, âge, sexe et état physiologique général de l'animal donneur et les résultats des épreuves de dépistage d'agents pathogènes qu'il a subi.

Pour les cellules microbiennes, le fabricant doit indiquer l'espèce, la souche et les caractères génotypiques et phénotypiques de l'organisme dont est issu le substrat cellulaire. Il doit aussi décrire la pathogénicité, la production de toxines et, s'il y a lieu, les autres risques biologiques qui y sont associés.

Il convient aussi de faire l'historique de la culture des cellules. Le fabricant doit décrire la technique d'isolement des cellules, de même que les méthodes de culture *in vitro* et toutes les opérations effectuées pour l'établissement des lignées cellulaires (par exemple, si l'on a utilisé des procédés physiques, chimiques ou biologiques ou introduit des séquences nucléotidiques). Il convient également de décrire toutes les manipulations génétiques ou sélections effectuées. Enfin, il faut fournir toute l'information disponible sur l'identité, les caractéristiques des cellules ainsi que les résultats des épreuves effectuées pour la détection des agents endogènes ou fortuits.

Pour les lignées continues de cellules de métazoaires, il est généralement indiqué de quantifier la durée de la culture en estimant soit le nombre de doublements de la population cellulaire ou le nombre de repiquages en précisant la dilution utilisée, ou encore le nombre de jours écoulés. Pour les lignées de cellules diploïdes à durée de vie limitée *in vitro*, il est important de donner une estimation exacte du nombre de

doublements de la population cellulaire durant toutes les phases de recherche, de développement et de production. Pour les cellules microbiennes, la documentation sur la fréquence des repiquages à compter de la mise en culture du substrat cellulaire est adéquate.

En ce qui touche la préparation des substrats cellulaires, les fabricants doivent discuter en profondeur les opérations durant lesquelles les cellules peuvent être exposées à des agents infectieux. Il faut décrire les composantes du milieu de culture et, en particulier, fournir des renseignements sur l'exposition des cellules à du matériel d'origine humaine ou animale tel que du sérum, des enzymes, des hydrolysats ou d'autres cellules vivantes. La description doit comporter des renseignements sur l'origine du matériel biologique, les méthodes de préparation et de contrôle, les résultats des analyses et le programme d'assurance de la qualité. Si elles sont disponibles, des publications pertinentes sur ces aspects peuvent être jointes. Ces renseignements permettront d'étudier en détail les voies d'entrée potentielles des agents fortuits pouvant être introduits à partir de ces sources, et fera partie de l'analyse des risques et des avantages que présente le produit.

2.1.3 Préparation du substrat cellulaire

Le choix de la lignée cellulaire parentale est déterminant. Pour les produits recombinants, la lignée cellulaire parentale est typiquement la lignée celllulaire receveuse non transfectée. Il est conseillé d'utiliser une banque de cellules parentales caractérisée, mais cette condition n'est pas essentielle. L'utilisation d'une banque de cellules parentales caractérisée peut présenter certains avantages, surtout lorsque différents substrats cellulaires sont obtenus à partir du même type de cellule parentale, en utilisant les renseignements concernant la banque de cellules parentales pour l'évaluation de la qualité de la banque de cellules primaires (BCP) . Par exemple, la lignée myélomateuse peut être utilisée pour constituer une banque de cellules parentales qui servira à produire des hybridomes.

Durant la préparation du substrat cellulaire, une ou plusieurs procédures spécifiques pourront être effectuées pour lui conférer des caractéristiques souhaitées. Celles-ci peuvent inclure la fusion cellulaire, la transfection, la sélection, l'isolement de colonies, le clonage, l'amplification de gènes et l'adaptation à des conditions ou à un milieu de culture particulier. L'information fournie sur les méthodes utilisées pour la préparation du substrat cellulaire peut aider à mieux comprendre l'histoire de ce dernier. Signalons toutefois que certains substrats cellulaires, comme, par exemple, les fibroblastes diploïdes humains, ne nécessitent pas de manipulation complexe, ni de clonage avant la constitution de banques de cellules.

Dans le cas des produits recombinants, le substrat cellulaire correspond à la cellule transfectée qui possède les séquences génétiques voulues laquelle a été clonée à partir d'une seule cellule génitrice. Pour en savoir davantage sur la préparation des substrats cellulaires obtenus par la technologie d'ADN-r, on se reportera aux autres lignes directrices pertinentes (régionales ou internationales). Dans le cas des produits ou des vaccins non recombinants, le substrat cellulaire correspond à la cellule de la lignée parentale choisie pour la constitution de la BCP sans modification ultérieure. Dans le cas des produits dérivés des hybridomes, le substrat cellulaire correspond à l'hybridome lui-même obtenu par la fusion de cellules myélomateuses parentales avec d'autres cellules parentales comme par exemple, des cellules spléniques immunes.

2.2. Banques de cellules

L'un des principaux avantages que présente l'utilisation de cellules obtenues par repiquages successifs pour la fabrication de produits biologique ou issus de la biotechnologie vient de ce que tous les lots de production sont issus d'une seule et même source caractérisée, soit la banque de cellules. Le fabricant peut constituer sa propre banque ou s'en procurer une chez un fournisseur. Quoi qu'il en soit, il lui incombe d'assurer la qualité de chaque banque de même que des analyses effectuées sur chacune d'elles.

2.2.1 Structure des banques

Le concept de la banque de cellules à deux niveaux par lequel la BCP est utilisée pour générer les banques de cellules de travail (BCT), est généralement reconnu comme la structure la plus pratique pour disposer d'un approvisionnement du substrat cellulaire permettant de fabriquer le produit sans interruption. Le fabricant doit expliquer comment il procédera pour assurer un approvisionnement continu en cellules à partir de ses banques, en indiquant notamment à quel rythme il pense utiliser ces dernières pour fins de production, quelle est la durée de l'intervalle prévu jusqu'à la préparation de nouvelles banques de remplacement de même que les critères pour la qualification des banques.

En général, on constitue d'abord la BCP, habituellement directement à partir d'un clone initial ou d'une banque préliminaire de cellules constituée à partir d'un clone initial. Il n'est pas jugé nécessaire de préparer une banque de cellules pour certains types de cellules (p. ex. les cellules diploïdes qui à cause de leur durée de vie limitée *in vitro* ou d'autres facteurs techniques rendent le clonage cellulaire difficile à effectuer), ou lorsque la population de cellules non clonées est déjà suffisamment homogène pour l'usage qu'on veut en faire.

La BCT est produite à partir d'un ou plusieurs des contenants constituant la BCP. Habituellement, les cellules de la BCT sont utilisées telles quelles pour la fabrication du produit. Suivant les besoins, on prépare d'autres BCT à partir de la BCP. Une BCT fraîchement préparée doit être adéquatement qualifiée en terme de caractérisation et de contrôles effectués.

Signalons que la BCP et la BCT peuvent différer l'une de l'autre à certains égards, notamment en ce qui touche les composantes du milieu de culture et les conditions de culture. En outre, les conditions de culture employées pour la préparation de ces banques peuvent être différentes de celles qu'on utilise pour le procédé de production. Si le changement de la méthode de culture n'a aucune influence sur la qualité du produit, il n'est pas nécessaire de recloner les cellules ou de reconstituer de nouvelles banques BCP et BCT. Il est important qu'une banque caractérisée donne un produit de qualité constante.

En principe, la banque à structure simple composée uniquement d'une BCP et ne comportant pas de BCT pourrait être utile, par exemple, lorsque la fabrication du produit ne nécessite qu'un nombre restreint de contenants à chaque année.

Pour certains systèmes d'expression microbiens, une nouvelle transformation est effectuée pour chaque nouveau lot de substrat cellulaire compte tenu que l'on utilise pour chaque transformation des aliquots de cellules hôtes et de plasmides provenant de banques rigoureusement contrôlées et que chaque banque de substrat cellulaire est soumise à des épreuves de contrôle. La banque de substrat cellulaire transformé ainsi obtenue est la BCP laquelle fournit le substrat cellulaire utilisé pour fins de production. Les banques de cellules hôtes, les banques de plasmides et les BCP sont préservées par les méthodes de conservation appropriées. Ce type de structure est considéré adéquat parce que la transformation des bactéries et des levures est généralement une opération facile et très reproductible, ce qui n'est pas le cas avec la transfection des cellules de métazoaires. Les fabricants doivent fournir de l'information sur les cellules hôtes et sur les molécules d'ADN-r (telles que les plasmides), sur la méthode de transformation et sur les banques de cellules qu'ils utilisent, ainsi que les résultats des études de caractérisation.

2.2.2 Préparation et entreposage des banques

Il importe que les substrats cellulaires contaminés (ou banques) ne soient pas utilisés pour la production afin d'éviter une perte de disponibilité du produit ou un retard dans le développement dû à la nécessité de recréer une banque de cellules devenue inutilisable par suite de contamination. Aucun programme de contrôle ne permet de détecter tous les agents susceptibles de contaminer les banques de cellules; il est par conséquent

indispensable d'observer des mesures de prévention durant les diverses opérations de la création d'une banque afin d'avoir une garantie raisonnable que la banque ne sera pas contaminée et assurer ainsi une source fiable de substrat cellulaire.

Le fabricant doit décrire la structure de ses banques, leur taille, le type de contenants (flacons, ampoules ou autres contenants appropriés) et le dispositif de fermeture utilisé, ainsi que les méthodes de préparation incluant les indications sur les agents cryoprotecteurs et les milieux utilisés, et les conditions de cryopréservation et d'entreposage. Le fabricant doit décrire les systèmes mis en place pour éviter la contamination microbienne et la contamination croisée par les autres lignées cellulaires présentes dans le laboratoire ainsi que les procédures permettant la localisation des contenants de la banque cellulaire. Ces renseignements doivent comprendre une description du système de documentation ainsi que du système d'étiquetage lequel doit résister aux méthodes de préservation, d'entreposage et de récupération employées sans perdre l'information apposée sur le contenant.

Le fabricant doit décrire les méthodes utilisées dans la préparation des banques de cellules. En général, les cellules sont préparées en augmentant progressivement le nombre ou la capacité des vaisseaux de culture jusqu'à ce que le pool de cellules obtenu soit suffisant pour générer le nombre de contenants nécessaire pour la banque. Pour assurer la composition uniforme du contenu de chaque contenant, il faut préparer un pool unique de cellules, en combinant les cellules de tous les vaisseaux de culture si plus d'un vaisseau est utilisé.

La suspension de cellules dans le milieu de conservation provenant d'un seul pool est répartie en fractions aliquotes dans des contenants stérilisés et fermés hermétiquement, qui sont alors conservés dans les conditions appropriées. Par exemple, les cellules d'origine animale, en suspension dans un milieu renfermant un cryoprotecteur, sont réparties dans des contenants scellés, congelées dans des conditions définies et contrôlées, puis entreposées dans la phase liquide ou gazeuse d'un dispositif refroidi à l' azote liquide ou à une température équivalente. Des méthodes différentes de préservation et d'entreposage peuvent être adéquates selon l'organisme visé, mais elles doivent permettre la conservation des cellules de telle façon que leur viabilité lors de la décongélation soit à la fois constante et suffisante pour les fins de production.

Pour assurer une production constante et ininterrompue, les fabricants doivent accorder toute l'attention nécessaire aux mesures qu'ils peuvent mettre en oeuvre pour se prémunir contre les catastrophes risquant de rendre leurs banques de cellules inutilisables, comme, par exemple, un incendie, une panne d'électricité ou une erreur humaine. Les fabricants doivent décrire les dispositions qui sont prises contre de telles éventualités; par exemple, conserver les contenants d'une même banque dans des congélateurs différents, prévoir une source d'électricité d'urgence, utiliser des systèmes automatiques d'approvisionnement d'azote liquide pour les unités d'entreposage, conserver une partie des BCP et des BCT dans un lieu éloigné des installations, ou régénérer la BCP.

Le point de départ pour l'évaluation de l'âge cellulaire *in vitro* pendant la production, doit être la décongélation d'un ou de plusieurs contenants de la BCP. Dans le cas des lignées de cellules diploïdes, la durée de vie *in vitro* est évaluée en termes de doublements de population. Le niveau de doublement de la population où se manifeste la sénescence doit être déterminé pour les lignées de cellules diploïdes.

2.3. Principes généraux concernant la caractérisation et la vérification des banques de cellules

La caractérisation et la vérification des banques de substrats cellulaires est un élément essentiel du contrôle des produits biologiques ou issus de la biotechnologie. Les renseignements qu'apporte la caractérisation de la BCP permettent de vérifier si elle est exempte de d'autre lignées cellulaires, d'agents fortuits, d'agents endogènes et de contaminants moléculaires (p. ex. des toxines ou des antibiotiques générés par l'organisme hôte). L'objectif est de vérifier l'identité et la pureté du substrat cellulaire et de déterminer s'il convient à des fins de production. Dans certains cas des épreuves additionnelles peuvent s'avérer utile, telles l'évaluation du pouvoir tumorigène ou un profil caryologique. Le choix du programme de vérification varie selon les propriétés biologiques des cellules (par exemple, les exigences de croissance), les antécédents de culture du substrat cellulaire (notamment l'utilisation de réactifs biologiques d'origine humaine ou animale) et les méthodes d'analyses disponibles. Par ailleurs, l'étendue de la caractérisation du substrat cellulaire peut influer sur le type ou le niveau d'épreuves à faire aux étapes plus avancées de la production. Des épreuves d'identité et de pureté doivent être effectués une fois pour chaque BCP de même qu'une évaluation de la stabilité des cellules durant l'étape de la culture cellulaire et ce pour chaque produit faisant l'objet d'une demande d'homologation. En outre, chaque BCT doit être soumise une fois à des épreuves de confirmation partielle d'identité et à des contrôles de pureté. De plus, le fabricant doit prendre connaissance de la ligne directrice l'ICH portant sur la sécurité virologique. Les épreuves pertinentes parmi celles décrites ci-après doivent être effectuées et décrites dans la demande de mise en marché en indiquant les résultats obtenus.

Dans le cas des lignées cellulaires recombinantes, on se reportera à la ligne directrice de l'ICH concernant les vecteurs d'expression d'ADN-r pour la caractérisation adéquate des séquences de nucléotides et d'acides aminés. Il peut aussi être utile d'évaluer, par des méthodes analogues, les séquences codantes de certaines lignées cellulaires non recombinantes dont les séquences de gènes ont été caractérisées et sont bien connues. Néanmoins, il n'est pas nécessaire d'étudier les séquences codant pour les produits naturels complexes comme, par exemple, les familles apparentées de produits de gènes, les antigènes de vaccins antimicrobiens ou les anticorps monoclonaux produits par des hybridomes.

Le fabricant est encouragé à utiliser les techniques de pointe disponibles et des techniques améliorées, lorsque disponibles, pour la caractérisation et la vérification des substrats cellulaires à la condition que la spécificité, la sensibilité et la précision des nouvelles méthodes soient au moins équivalentes à celles des méthodes en usage.

Le fabricant peut choisir de caractériser la BCT au lieu de la BCP, si un tel choix est justifié.

2.3.1. Épreuves d'identité

Les analyses appropriées doivent être effectuées pour déterminer si les cellules de la banque sont ce qu'elles sont censées être. Les épreuves d'identité peuvent porter sur les caractères phénotypiques ou génotypiques et il n'est pas nécessaire de faire toutes les épreuves possibles. Les épreuves d'identité sont généralement effectuées sur la BCP. En plus, des épreuves limitées d'identité sont effectuées sur chaque BCT.

2.3.1.1 Cellules de métazoaires

Dans le cas des cellules adhérentes d'origine humaine ou animale une analyse morphologique pourrait être utile lorsque combinée à d'autres épreuves. Dans la plupart des cas une analyse d'isoenzymes suffit pour confirmer l'identité des lignées cellulaires d'origine humaine ou animale; d'autres épreuves peuvent être indiquées, dépendant de l'histoire de la lignée cellulaire. On peut employer des techniques différentes pour confirmer l'espèce d'origine, notamment l'analyse cytogénétique de bandes chromosomiques ou le sérotypage au moyen d'antisérums spécifiques d'espèces. On pourrait aussi démontrer la présence de marqueurs spécifiques, par exemple en utilisant l'analyse cytogénétique de bandes chromosomiques pour mettre en évidence un chromosome marqueur unique, ou l'analyse de l'ADN pour mettre en évidence un polymorphisme génomique

(p. ex.: un polymorphisme de longueur des fragments de restriction «FRLP», un nombre variable de séquences répétées en tandem «VNTR» ou de dinucléotides génomiques répétés). Quel que soit le facteur confirmé (identité de l'espèce d'origine ou la présence de marqueurs spécifiques à la lignée cellulaire), il est considéré suffisant aux fins de vérification de l'identité. L'expression du produit recherché pourra constituer une approche complémentaire pour la confirmation de l'identité.

2.3.1.2 Cellules microbiennes

Pour la plupart des cellules microbiennes, l'évaluation de la croissance sur des milieux sélectifs suffit à confirmer l'espèce à laquelle appartiennent la cellule hôte et la banque de cellules transformées. Dans le cas de *E. coli,* où une variété de souches peuvent être employées, les méthodes de caractérisation biologique comme la lysotypie sont à envisager comme épreuve additionnelle d'identité. Pour ce qui est des banques de plasmides on peut en confirmer l'identité suivant les indications donnés à ce sujet dans le document de l'ICH concernant l'analyse des vecteurs d'expression. L'expression du produit recherché représente également un moyen adéquat de confirmer l'identité d'un vecteur d'expression microbien.

2.3.2 Épreuves de pureté

L'évaluation de la pureté des banques, tant de la BCP que de la BCT représente une étape majeure dans le développement d'une lignée cellulaire et la préparation des banques. Il s'agit de vérifier si les banques sont biologiquement pures, c'est-à-dire si elles sont exemptes d'agents microbiens et de contaminants cellulaires fortuits. Lors de la planification et l'exécution des épreuves de pureté, il faut tenir compte des effets potentiels des marqueurs de sélection et des antibiotiques sur la détection des contaminants microbiens fortuits.

2.3.2.1 Cellules de métazoaires

Des contenants de la BCP et des BCT (1 % du nombre total de contenants mais pas moins de deux) doivent être soumis à des épreuves de charge biologique ("Bioburden") permettant d'identifier la présence de bactéries et de champignons microscopiques. Pour tous les autres paramètres, les méthodes décrites dans les plus récentes pharmacopées européenne, japonaise ou américaine pour l'évaluation du nombre limite de microorganismes ou de la stérilité peuvent être considérées adéquates.

La BCP et les BCT doivent subir des épreuves de détection de mycoplasmes. Les techniques courantes de la gélose et du bouillon de culture ainsi que celle de la culture indicatrice sont considérées adéquates. Des méthodes courantes de détection des mycoplasmes sont décrites dans les pharmacopées européenne et japonaise ainsi que dans un document produit par le FDA sur la caractérisation des lignées cellulaires utilisées pour la fabrication de produits biologiques (« Points to Consider in the Characterisation of Cell Lines Used to Produce Biologicals ») (FDA, CBER, 1993). L'évaluation des cellules provenant d'un seul contenant est généralement considérée adéquate. Pour les lignées cellulaires d'origine animale autres que mammifères, d'autres types de vérifications et/ou de conditions d'épreuves peuvent convenir; le fabricant s'adressera aux autorités de règlementation nationale ou régionale, selon le cas, pour connaître les méthodes appropriées.

Si les tentatives futures d'harmonisation des épreuves de la charge biologique ("bioburden") et de mycoplasmes sont couronnées de succès, l'épreuve harmonisée scientifiquement appropriée devra être utilisée.

L'évaluation virale du substrat cellulaire doit être planifiée de façon à détecter un large spectre de virus en utilisant des épreuves de criblage et autres épreuves spécifiques appropriées axées sur les antécédents de culture de la lignée cellulaire pour la mise en évidence de virus contaminants potentiels. Le répondant se reportera à la ligne directrice de l'ICH sur la sécurité virologique. Pour les classes de produits qui ne sont pas traitées dans cette ligne directrice, le fabricant peut consulter les dernières publications de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) sur l'utilisation des cellules d'origine animale.

La contamination des substrats cellulaires par des lignées cellulaires de la même espèce ou d'une espèce différente peut compromettre la pureté de ces derniers. Le choix des épreuves à réaliser dans ce cas est effectué en fonction du fait qu'il y a ou non des risques de contamination croisée par d'autres lignées cellulaires. Il est parfois nécessaire de garder différentes lignées cellulaires dans un même laboratoire. Certaines des opérations liées à la préparation d'une banque de cellules s'exécutent sans confinement, et il faut donc éviter de traiter plusieurs lignées cellulaires simultanément. Si, durant les opérations sans confinement de la préparation d'une banque de cellules (telles que la multiplication, la constitution du pool cellulaire et la répartition dans les contenants de culture), une autre lignée cellulaire que celle devant constituer la banque est manipulée, celle-ci doit être soumise à des épreuves permettant de mettre en évidence les cellules

(ou les produits cellulaires) de la deuxième lignée. En général, les méthodes d'identification décrites à la rubrique *2.3.1* conviennent aussi pour la détection de la contamination croisée. Le fait que le substrat cellulaire fabrique le produit recherché pourra être considéré comme une preuve additionnelle de l'absence de contamination croisée.

2.3.2.2 Cellules microbiennes

Dans la conception et l'exécution des épreuves spécifiques destinées à mettre en évidence les agents microbiens fortuits ou les contaminants cellulaires fortuits présents dans les banques de cellules microbiennes, divers facteurs doivent être pris en compte incluant les propriétés de la banque de cellules, la présence de contaminants probables d'après les publications scientifiques, l'origine, les méthodes et les ingrédients utilisés pour la culture de même que la présence d'autres organismes dans le laboratoire de préparation de la banque. Par exemple on peut évaluer visuellement les caractéristiques de colonies bien isolées obtenues au moyen de divers milieux microbiologiques dont certains supportent et d'autres ne supportent pas la croissance du substrat cellulaire. Cependant l'intention n'est pas de suggérer que le fabricant doive nécessairement caractériser les mutants résistants du substrat cellulaire résultant de telles études, ou d'autres artéfacts résultant de tels essais. Plutôt, le but de ces épreuves est de détecter des agents contaminants existants.

2.3.3 Stabilité du substrat cellulaire

La caractérisation des cellules doit aussi permettre de déterminer si le substrat cellulaire convient pour l'usage auquel il est destiné. Il existe deux sources d'incertitude au sujet de la stabilité du substrat cellulaire: assurer l'uniformité de production du produit souhaité et la rétention de la capacité de production pendant l'entreposage dans les conditions spécifiées.

La stabilité des cellules mises en culture pour la production doit être vérifiée au moins à deux moments de la période de culture, le premier en utilisant des cellules qui ont fait l'objet d'un nombre minimum de repiquages et en second lieu lorsqu'elles ont atteint ou dépassé l'âge limite de production *in vitro* indiqué dans la demande de mise en marché. L'âge cellulaire *in vitro* doit avoir été établi d'après les données recueillies sur des cellules multipliées pour une production à l'échelle pilote ou à l'échelle commerciale

jusqu'à ce qu'elles aient atteint ou dépassé l'âge limite de production *in vitro*. En général, on obtient les cellules de production en multipliant des cellules de la BCT; on peut utiliser des cellules de la BCP, si ce choix est adéquatement justifié. La stabilité du substrat cellulaire est habituellement démontrée une fois pour chaque produit faisant l'objet d'une demande de mise en marché.

L'évaluation du substrat cellulaire a pour but avant tout d'assurer l'uniformité du procédé de fabrication du produit souhaité. La nature des épreuves utilisées et des paramètres évalués dépend du type de substrat cellulaire, des méthodes de culture employées et du produit recherché. Dans le cas des lignées cellulaires transfectées avec des vecteurs d'expression d'ADN recombinant, l'uniformité de la séquence codante du vecteur d'expression doit être évaluée dans des cultures de cellules ayant atteint ou dépassé l'âge cellulaire limite de production *in vitro*, soit par une analyse de l'acide nucléique ou l'analyse du produit, suivant les indications fournies dans la ligne directrice de l'ICH applicable. Dans le cas d'une lignée cellulaire non recombinante pour laquelle la séquence codante du produit recherché a été analysée lors de la caractérisation de la BCP ou des BCT, il faudra vérifier la stabilité de la séquence codante de la protéine durant la production. Cette vérification est effectuée dans des cellules de production ayant atteint ou dépassé l'âge limite de production *in vitro*, soit par l'analyse de l'acide nucléique ou l'analyse de la protéine purifiée.

Lorsque le produit ne peut être analysé suivant les indications données ci-dessus, d'autres paramètres spécifiques peuvent être utiles pour évaluer la stabilité du substrat cellulaire : il peut s'agir, par exemple, de caractéristiques morphologiques, de caractéristiques de croissance, de marqueurs biochimiques et immunologiques, du rendement en produit recherché ou d'autres marqueurs génotypiques ou phénotypiques appropriés. Dans certains cas, lorsqu'il peut être difficile ou impossible de faire une comparaison directe entre les cellules de la BCP et des cellules de production ayant atteint ou dépassé l'âge limite *in vitro*, on peut alors comparer les caractéristiques de ces dernières à celles des cellules obtenues aux premiers stades de culture ou de production. Pour cette évaluation, des paramètres tels que la consommation d'oxygène ou de glucose, ou la production d'ammoniac ou de lactate peuvent être utiles. L'âge limite de production *in vitro* pourra être augmenté à la condition que les données fournies résultent de l'observation de cellules cultivées jusqu'à la nouvelle limite proposée. Dans le cas des lignées de cellules diploïdes les données présentées doivent permettre d'établir la durée de vie *in vitro* des cellules de la BCT dans des conditions représentatives des conditions de production.

La stabilité des banques de cellules conservées dans des conditions d'entreposage définies est généralement démontrée lors de la préparation du matériel d'essai clinique à partir des banques de cellules. Lorsqu'on réactive des cellules pour produire du matériel d'essai clinique, on évalue leur viabilité; les résultats de cette évaluation indiquent si les cellules survivent au procédé de conservation. Par ailleurs, les données recueillies durant la préparation du matériel d'essai clinique indiquent si les cellules réactivées pourront être utilisées pour fabriquer le produit recherché. Le fabricant doit présenter ces données, avec une documentation claire, dans les dossiers de la demande et soumettre un projet de programme de surveillance de la stabilité des banques de cellules. Selon ce qui convient le mieux, cette surveillance peut être exercée lorsque des contenants cryopréservés sont décongelés à des fins de production, lorsque le produit ou l'uniformité de la production est évalué de façon appropriée ou lorsque un ou plusieurs contenants de la BCP sont utilisés pour la préparation d'une nouvelle BCT (et que la nouvelle BCT est adéquatement qualifiée). Si la mise en production ne commence qu'après un long délai, l'évaluation de la viabilité des cellules de la banque utilisée comme source de substrat de production devrait être effectuée à un intervalle de temps spécifié dans la demande de mise en marché. Si la viabilité du substrat cellulaire n'a pas diminué de façon significative, il n'est généralement pas nécessaire de procéder à des évaluations additionnelles de la BCP ou des BCT.

2.3.4 Épreuves de caryotype et de tumorigénicité

Dans l'évaluation de l'innocuité d'une lignée de cellules diploïdes ou lors de la caractérisation d'une nouvelle lignée cellulaire, il peut être utile de déterminer le caryotype et le pouvoir tumorigène, tout dépendant de la nature des cellules, du produit fabriqué et du procédé de fabrication. Une analyse exhaustive pour identifier la quantité relative de cellules aneuploïdes ne s'est pas révélée utile. Il n'est pas utile non plus de déterminer le caryotype des lignées de cellules de rongeurs et des nouvelles lignées de cellules non diploïde. L'analyse cytogénétique peut toutefois être indiquée pour déterminer l'identité d'un substrat cellulaire ou évaluer sa pureté, comme indiqué aux rubriques *2.3.1* et *2.3.2*. Par ailleurs, il n'est pas nécessaire de répéter les épreuves de tumorigénécité pour des cellules dont l'action tumorigène est déjà documentée.

Dans le cas des produits purifiés ne contenant aucune cellule, l'évaluation du caryotype et des propriétés tumorigènes n'est généralement pas nécessaire, à la condition que la concentration de l'ADN résiduel des cellules hôtes soient dans les limites appropriées et ce, de façon consistante, tel que demontré lors des études de validation du procédé de fabrication ou par les épreuves de libération des lots.

En général, lorsqu'il est impossible d'exclure tout à fait la présence de cellules vivantes dans un produit ou lorsque le produit ne subit pas une purification très poussée (comme c'est le cas, par exemple, de certains vaccins atténués classiques), l'évaluation du caryotype et des propriétés tumorigènes du substrat cellulaire s'impose. En ce qui a trait aux nouveaux substrats cellulaires servant à produire des produits non purifiés, l'utilité de cette évaluation est à déterminer dans chaque cas. Lorsqu'un produit contient des cellules ou qu'il n'est pas très purifié, on décide s'il est justifié d'utiliser l'utilisation des lignées cellulaires ayant des propriétés tumorigènes ou dont le profil caryologique est anormal doit être évalué à la lumière des risques et des avantages que présente chacune des applications du produit en question.

Il n'est pas nécessaire d'évaluer le caryotype et les propriétés tumorigènes des substrats cellulaires préparés à partir de cellules MRC-5 ou WI-38 non génétiquement modifiées, car de nombreuses études de caractérisation ont été publiées sur ces lignées. Toutefois, pour chaque BCT préparée à partir de cellules MRC-5 ou de cellules WI-38, le fabricant doit confirmer une fois seulement, que les cellules, lorsqu'elles sont cultivées par la méthode devant être utilisée pour la production sont bel et bien diploïdes et ont la durée de vie prévue.

Il convient de confirmer la diploïdie des nouveaux substrats de cellules diploïdes ou des substrats de cellules diploïdes encore jamais caractérisés, et de déterminer leur pouvoir tumorigène, en utilisant à cette fin les cellules de la BCP. Des méthodes d'évaluation du caryotype et des propriétés tumorigènes sont décrites dans les exigences techniques de l'OMS concernant l'utilisation de cellules d'origine animale comme substrat *in vitro* pour la production de produits biologiques (« WHO Requirements for Use of Animal Cells as *in vitro* Substrate for the Production of Biologicals ») énoncées par le *Comité d'experts de l'OMS sur la normalisation biologique* (47e rapport, Genève) de l'*Organisation mondiale de la Santé* (OMS, Série de Rapports techniques, sous presse).

3.0. GLOSSAIRE

Âge cellulaire *in vitro*: Mesure du temps écoulé entre la décongélation de flacon(s) de la banque de cellules primaire et la récolte du bioréacteur de production. Cette période est mesurée en temps réel et est exprimée en fonction du nombre de doublements des cellules ou par le nombre de repiquages, lorsque la sous-culture est faite selon une méthode spécifique pour la dilution de la culture.

Banque de cellules: Ensemble de contenants appropriés dont le contenu a une composition uniforme et qui sont conservés dans des conditions définies. Chaque contenant représente une fraction aliquote d'un seul type de cellules.

BCP (Banque de cellules primaires): Fraction aliquote d'un seul type de cellules qui a généralement été préparée à partir du clone cellulaire choisi, dans des conditions déterminées, répartie dans plusieurs contenants et conservée dans des conditions déterminées. Toutes les banques de cellules de travail sont obtenues à partir de la banque de cellules primaire. Les analyses pratiquées sur une nouvelle banque de cellules primaire (dérivée d'un clone initial antérieur, d'une banque de cellules primaire ou d'une banque de cellules de travail) devraient être les mêmes que celles effectuées sur la banque de cellules primaire.

BCT (Banque de cellules de travail): Banque de cellules préparée à partir de fractions aliquotes d'une suspension homogène de cellules obtenues par la culture de la banque de cellules primaire dans des conditions de cultures définies.

Cellule-hôte: *Voir cellule parentale.*

Cellule parentale: Cellule dont dérive, par suite d'une manipulation, un substrat cellulaire ou une lignée cellulaire intermédiaire. Dans le cas de systèmes d'expression microbiens, on parle plutôt de cellule-hôte. Pour les hybridomes, il est typique de décrire les cellules parentales comme les cellules à être fusionnées.

Lignée cellulaire: Population de cellules obtenue par repiquage en série d'une population cellulaire initiale et pouvant servir à constituer une banque de cellules.

Lignée cellulaire continue: Lignée de cellules capables de se multiplier indéfiniment, aussi appelée lignée « immortelle » et précédemment désignée comme lignée "établie".

Lignée cellulaire diploïde: Lignée de cellules à durée de vie limitée *in vitro* dont les chromosomes, en doubles exemplaires (euploïdes), sont identiques par leur structure aux chromosomes de l'espèce dont les cellules sont issues.

Métazoaire: Animal pluricellulaire.

ANNEXE 1 : SUBSTRATS DE CELLULES PRIMAIRES

I. Introduction

Les principes énoncés dans le présent document s'appliquent en général aux produits biologiques ou issus de la biotechnologie préparés à partir de banques de cellules caractérisées. Toutefois, un certain nombre de produits biologiques, et plus particulièrement certains vaccins viraux, sont préparés au moyen de cellules primaires.

Comme les cellules primaires sont utilisées dès le premier repiquage, après leur mise en culture à partir du tissu d'origine, il est impossible de les caractériser en détail avant qu'elles ne soient utilisées, comme on peut le faire pour les substrats cellulaires issus de banques de cellules. De plus, bon nombre des produits biologiques fabriqués au moyen de cellules primaires ne subissent aucun traitement poussé (p. ex. une purification). Malgré ces différences, pour vérifier si les substrats de cellules primaires sont appropriés et sécuritaires pour l'élaboration des produits biologiques recherchés, on applique une approche qui ressemble à bien des égards à celle qui est décrite dans la présente ligne directrice ainsi que dans d'autres documents références.

Dans la présente annexe, est indiquée l'information que le fabricant doit fournir sur le substrat cellulaire dans sa demande de mise en marché, lorsque celle-ci porte sur un produit biologique obtenu au moyen de cellules primaires. En fait, les renseignements à fournir concernent trois points : 1) la source du tissu ou organe d'origine et toute autre matière brute d'origine animale utilisée dans la préparation du substrat de cellules primaires, 2) la méthode de préparation du substrat de cellules primaires et 3) les analyses effectuées sur le substrat de cellules primaires pour assurer l'innocuité du produit.

II. Origine du tissu et autres matières brutes

Le fabricant doit fournir des renseignements sur les animaux dont proviennent les tissus utilisés pour préparer les substrats de cellules primaires. Les tissus doivent être prélevés sur des sujets sains certifiés exempts d'agents pathogènes suite aux contrôles vétérinaires et en laboratoire. Dans la mesure du possible, les animaux donneurs doivent provenir de colonies ou de troupeaux élevés en isolement et exempts d'agents pathogènes. Il ne doivent pas avoir été utilisés préalablement pour d'autres travaux expérimentaux. Ils doivent être isolés en quarantaine de durée suffisante avant que leurs tissus soient utilisés pour la préparation de substrats cellulaires. Certains pays exigent que les animaux soient mis en quarantaine dans le pays où les cellules primaires doivent être préparées. Le fabricant doit s'informer des exigences à remplir auprès des autorités nationales ou régionales concernées.

Le fabricant doit fournir des renseignements sur les matériaux et les composantes entrant dans la préparation des substrats de cellules primaires et indiquer l'identité et la provenance de tous les réactifs d'origine humaine ou animale employés. Il convient en outre de décrire les analyses et les épreuves auxquelles on soumet les matières d'origine animale pour certifier qu'elles sont exemptes de contaminants et d'agents fortuits détectables.

III. Préparation du substrat de cellules primaires

Le fabricant doit décrire les méthodes utilisées pour isoler les cellules du tissu d'origine, pour établir les cultures de cellules primaires et pour entretenir les cultures cellulaires établies.

IV. Analyses des substrats de cellules primaires

Le fabricant doit décrire les épreuves et les analyses de qualification effectuées pour déterminer si le substrat de cellules primaires peut être utilisé à des fins de production. Comme nous l'avons déjà signalé, en raison même de la nature du substrat, il est impossible de faire des vérifications et une caractérisation poussées avant la mise en production: c'est donc pendant la production que l'on vérifie si le substrat est exempt d'agents fortuits. Cette vérification peut comporter les opérations suivantes : observation des cultures de production ou de cultures témoins non infectées avant, pendant et en deçà de la période de production; inoculation de liquides provenant de cultures de production et de cultures témoins non infectées à diverses cultures de cellules indicatrices (permettant de détecter une gamme étendue de virus) suivi de l'observation de changements cytopathogènes et épreuves pour mettre en évidence des virus hémadorbants, de même que d'autres épreuves pour déceler des agents particuliers (tels que des rétrovirus) si besoin est. Des renseignements additionnels concernant certaines épreuves virologiques spécifiques sont donnés dans les directives nationales, régionales ou internationales applicables.

Les cellules doivent être soumises à un ensemble d'épreuves dont la nature, ainsi que celle des méthodes à employer pour les réaliser, varient selon l'espèce dont provient le tissu utilisé, la nature des agents fortuits qui pourraient être présents, la nature du produit, l'usage clinique auquel il est destiné, les divers aspects du procédé de fabrication et l'étendue des analyses auxquelles est soumis le produit final. Le fabricant doit expliquer et justifier son approche en fonction du produit.